

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12560

研究課題名(和文)細胞内・表面センシングを対象とした多機能性微小プローブ型センサの開発

研究課題名(英文)Multi-functional probe type pH sensor for intracellular or cell surface sensing

研究代表者

槌谷 和義 (Tsuchiya, Kazuyoshi)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：50399086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞直径が数十マイクロメートルである単一細胞へ、先端直径5[μm]以下を有するpHおよび温度センサを細胞死滅させることなく穿刺し、細胞内の情報をセンシングする、細胞を対象としたプローブ型多機能センシングシステムの開発が目的である。特に本研究の成果としては、(1)細胞に振動を与えることで細胞の見かけ上の剛性が高くなり細胞への穿刺が容易となることを確認し、(2)標準液を用いてpHと電圧との間に線形性の確認が取れたpHセンサと同センサを構成する材料の間のゼーベック効果を利用した温度センサの細胞穿刺により、局所pHおよび温度に関する直接測定が可能となったことである。

研究成果の概要(英文)：The detection of temperature and pH at the single-cell level is hoping for the great level of clinical importance for the early detection of many diseases like cancer, diabetes, etc. In this research work, we have fabricated a micro region pH and temperature sensors by series of processes like electrolytic polishing to create needle structure, deposition of electrode materials using sputtering for measurements and finally testing in various biological medium. The fabricated tip of the microneedle probe is nearly 5μm analyzed by laser microscope. pH testing was evaluated using fish egg and the found that results were significant. Seebeck co-efficient observed for the micro region temperature sensors is relatively low compared to theoretical values. The vibration of the needle to inject into a cell can make apparent young's modulus larger so that the injection force for cell will be reduced.

研究分野：医用工学

キーワード：マイクロニードル pHセンサ 温度センサ 単一細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、細胞を物理的、化学的にセンシングすることで、現在問題になっている変成ウイルスの RNA 転写・複製に影響を与える因子の解明への、様々な情報取得が可能となることから、細胞 1 個の様々な情報を取得するための研究が進んでいる。

ここで世界的で活発に進められている学術的動向の共通の課題としては、どの手法も、生きた単一細胞への多角的な生体情報センシングが困難であることである。

2. 研究の目的

変成ウイルスの仕組み解明が急務であるにもかかわらず、外径 10-30 [μm] を有する細胞への微小生体情報(pH、細胞内温度、細胞外皮硬さなど)センシングに応えるべく技術が存在しないことが問題視されている。そこで本申請では、現在まで不可能であった、一つの生きた細胞を対象とした極微小領域での物理的・化学的センシングおよび *in-situ* の連続生体情報変化観察が可能な多機能性センサ開発を目的とする。具体的には、蚊の口並みの無痛針開発で培った極細管創製技術を用いて、物理的・化学的な基礎情報である pH、硬さ、温度を外径 1-10 [μm] の先端径を有する「見かけ上 1 電極」同心円状の極微小領域センサとして集積し、細胞を対象としたプローブ型多機能センシングシステムを世界に先駆けて開発することである。

3. 研究の方法

研究期間は、2 年間とし、下記の課題に取り組む。

申請者は、蚊の口並みの無痛針開発で培った極細管創製技術を用いて、固体電極のみで構成された外径 100μm を有する「見かけ上 1 電極」の同心円状プローブ型極微小領域 pH センサを実現していることから、本研究課題では、同創製手法を基盤技術として、「pH」、「細胞内温度」、「細胞外皮硬さ」を集積化したプローブ型一体化センサの試作を目的とし、下記の課題に取り組む。

- (1) pH センサ：先端径 1-10 μm、5mV/0.1pH の精度を有するセンサの実現
- (2) 硬さセンサ：ポアソン比 0.5 程度の細胞用粘弾性ナノインデンテーション法の確立
- (3) 温度センサ：0.1 /s の精度を有するゼーベック効果を用いた細胞用温度測定法の確立

4. 研究成果

年度ごとの研究成果を下記に示す。

【初年度】

今年度は、(1) 細胞直径が 30 ~ 50 [μm] である単一細胞へのセンサ穿刺のために、電解研磨にてセンサ先端寸法を先端直径 5 [μm] 以下

で創製、(2) スパッタリング法により創製可能であった 2 電極一体型の pH センサ材料である銀とアンチモンを用い、両材料間のゼーベック効果を利用した熱電センサの開発を行った。

表 1 には、スパッタリング法によるセンサ創製条件を示す。マイクロスコopより観察した結果を図 1 に示す。その結果、観察像において先端平面部分の直径約 5 [μm] を確認し、画像解析ソフトウェア ImageJ よりテーパ部分の角度を 44.6 [°] を確認した。従って、目標寸法 5 [μm] 以下を満たす事から、細胞に穿刺可能な熱電センサの創製を確認した。

Table1 RF magnetron sputtering condition.

| Target | Sb | Ag |
|----------------------------|----|----|
| Flow rate of Ar gas [sccm] | 50 | |
| Sputtering time [min] | 80 | 62 |
| Distance from target [mm] | 40 | |
| Microwave power [W] | 80 | |

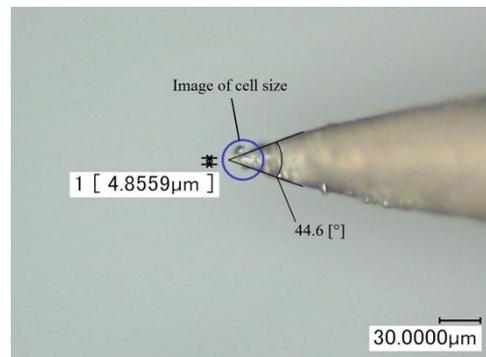


Fig.1 Sb-Ag sputtered.

つぎに鮭の卵細胞へのセンサ穿刺時の細胞の内部温度の測定を行った。温度領域としては 30 ~ 45 [°C] の範囲の温度と電位差の関係を求め、その測定結果を図 2 に示す。電位差は、ホットプレートにて卵細胞に与えた。その結果、温度刺激に追従するように電圧変化を確認した。

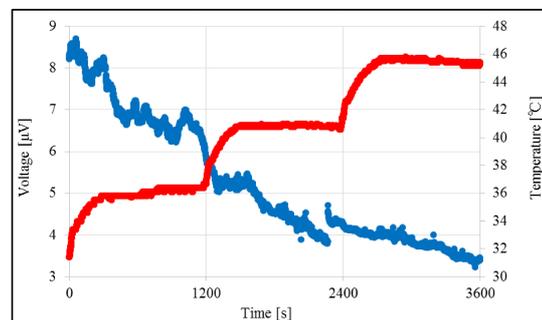


Fig.2 Temperature - voltage of a salmon roe.

以上より、以下の知見を得た。

- (1) Sb-Ag 熱電センサを針形状に創製した結果、先端直径約 5 [μm]、テーパ部分の角度は 44.6 [°]であり細胞に穿刺可能であることを確認した。
- (2) 30 ~ 45 []の温度領域で、温度と電位差に線形近似の関係が見られ、細胞の温度を測定が可能であることを確認した。
- (3) 創製した Sb-Ag 熱電センサにおいてゼーベック係数約 3.3 [nV/]を確認した。
- (4) 同センサの細胞への穿刺、およびセンシングが可能であることを確認した。

【最終年度】

最終年度は、(1) 細胞直径が 30 ~ 50 [μm] である単一細胞へのセンサ穿刺のために、細胞を死滅させることなく穿刺可能な穿刺条件の探索(解析および実験)、(2) 先端直径 5 [μm]以下を有する pH センサによる、極微小領域のセンシングを目的とした動物実験を行った。

本研究では、細胞へ振動が与えられていない静的な細胞解析モデルのヤング率と比較する事で、振動援用による剛性の変化を評価した。まず、モーダル解析を行い、各モードで細胞が穿刺方向に変形しているモードの固有振動を求める。手順としては以下の通りである。

- (1)固有振動に等しい周波数の荷重を Sin 波で穿刺方向に印加し、周波数応答解析を行う。
- (2)細胞表面の応力と変形量を求める。
- (3)穿刺解析については、物性値として静的なヤング率と振動援用下の動的なヤング率を細胞モデルに与え、細胞表面の変形量の最大を評価する解析を行い比較する。

動的な細胞のヤング率と周波数の関係のグラフを図 3 に示す。モデルの物性値に用いた静的な細胞のヤング率 5kPa に対して、いずれにおいても振動援用によるヤング率の向上を確認し、振動援用の有効性を確認した。

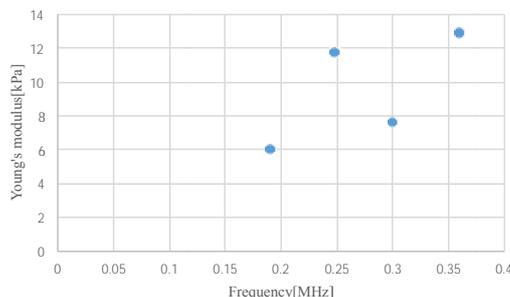


Fig.3 Young's modulus change for cell surface with various vibrating frequency.

つぎに、形状の最適化を行うにあたり、実験計画法を用いて解析を行い、細胞変形の減少に有効な因子を決定した。ただし、針を 10μm 穿刺したときの細胞表面の変形量の最

大を評価値とした。その結果を表 2 に示す。表より、因子 A 先端直径において 99 %の有意性と 85.59%の最も高い寄与率を確認した。このことから先端直径が最大変形の減少に大きく有効であることが示唆された。

つぎに針が穿刺に耐えうるかの確認を針への応力解析より行った。先端直径 1μm, 根本の直径 50μm, テーパ角度 10°~50°の範囲で穿刺を行い、針内部の応力を求めた結果、センサ最適形状は先端直径約 1μm 以下であれば、穿刺可能な剛性を有することを確認した。

Table 2 Contribution ratio of needle shape.
: 95 [%] : 99[%]

| Factor | Decision | Contribution ratio |
|----------|----------|--------------------|
| A:先端直径 | ☆☆ | 85.59% |
| B:針太さ | ☆ | 5.63% |
| C:先端テーパ角 | | 0.00% |
| A×B | ☆ | 5.63% |

つぎに生体内への穿刺による pH センサの有効性を確認した。

同実験で用いたセンサについて記述する。Ag/AgIO₃ 電極法に基づく pH センサを W ワイヤ上に創製する。電解研磨により尖頭化した直径 0.3 mm の W ワイヤ上に、Sb をスパッタリング法により成膜する。その後、大気開放を行うことにより Sb が酸化し、Sb₂O₃ 層が生成される。つぎに、Sb/Sb₂O₃ と Ag/AgIO₃ 間を絶縁する内径 0.8 mm、外径 1.0 mm の PTFE チューブを針に固定するため、針の先細り面に 0.35 mm、外径 0.8 mm の真鍮のパイプを圧着し、絶縁層として PTFE チューブを被せる。そして、Ag/AgIO₃ 層との結線のために内径 1.15 mm、外径 1.6 mm の真鍮のパイプを圧着し、Ag/AgIO₃ ペーストを絶縁膜と真鍮の先端部にかけて塗布する。最後に導線を結線することにより、同一の針上に Ag/AgIO₃ 電極と Sb/Sb₂O₃ が絶縁された構造が創製され、2 電極法による pH センサが構成可能となる。

同実験では、穿刺箇所は出生 4 カ月後の C57BL/6NJcl (♀) マウスの小脳延髄槽内と外気に露出した脳組織内とし、吸引麻酔装置を用いてイソフルランを導入 4-5%、維持 2-3 % の濃度で使用し、42 の電気マット上でマウスの体温を保持しながら測定した。また、脱水症状対策として施術前にマウスの四脚部から皮膚下に生理食塩液を 0.6 mL 注入し、測定時間は 1 分間とし、0.1 秒毎に電圧測定を行った。脳組織内への穿刺時の状態を図 4 に、脳組織内にセンサを浸漬した時の電圧測定結果をそれぞれ図 5 に示す。

同図より、脳組織内の平均電圧は、-321.3 mV であったため、図 6 より脳組織内 pH は 8.8 であった。以上より、高剛性針型微小領域 pH センサを創製し、生体内局所 pH の直接的測定を実現した。

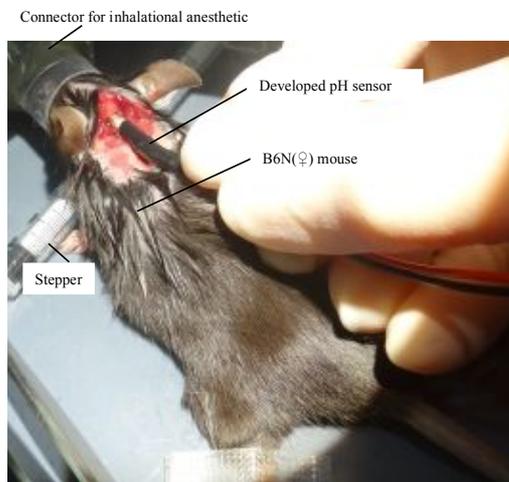


Fig.4 Experiment on mice.

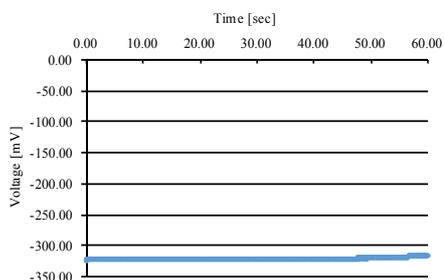


Fig.5 Result of voltage measurement of spinal fluid.

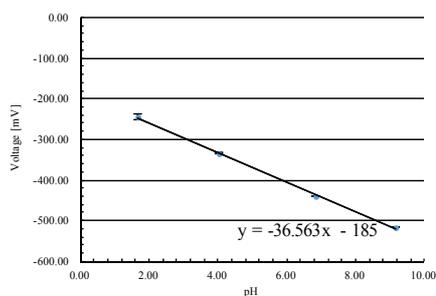


Fig.6 MV - pH corresponds.

以上より、以下の知見を得た。

- (1) 細胞に振動を与えることで細胞の見かけ上の剛性が高くなり細胞への穿刺が容易となることを確認した。
- (2) 細胞への変形量を評価値とした場合、先端直径に 99%の有意性、先端直径と針直径の交互作用に 95%の有意性を確認した。
- (3) センサ最適形状は先端直径約 1 μ m 以下であれば、穿刺可能な剛性を有することを確認した。
- (4) 標準液を用いて pH と電圧との間に線形性の確認が取れた pH センサを用いて、高剛性針型微小領域 pH センサの生体穿刺による生体内局所 pH の直接的測定を確認した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔 雑誌論文 〕 (計 2 件)

1. Tsuchiya Kazuyoshi, Aljarf Saad Mohammad, Kaneko Daiki, Kajiwara Kagemasa, Kimura Minoru , Development of one electrode type pH sensor measuring in microscopic region The International Journal of Applied Electromagnetics and Mechanic, vol. 52, no. 3-4, pp. 1417-1424(2016).

2. Ganesh Kumar Mani, Madoka Morohoshi, Yutaka Yasoda, Sho Yokoyama, Hiroshi Kimura and Kazuyoshi Tsuchiya, ZnO Based Microfluidic pH Sensor: A Versatile Approach for Quick Recognition of Circulating Tumor Cells in Blood, Applied materials & Interfaces, 9 (6), pp 5193–5203(2017)

〔 学会発表 〕 (計 5 件)

1. Ganesh Kumar Mani, Yutaka Yasoda, Gaku Tsuruzoe, Fumio Eura and Kazuyoshi Tsuchiya, A Novel Electrolyte Free Solid State pH Sensor for Bio-MEMS Applications, IEEE 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science(MHS), 28-30 November 2016, Nagoya University(2016).

2. Gaku Tsuruzoe and Kazuyoshi Tsuchiya, Development of the pH Measurement Sensor to be Mounted on the Oral Measurement Device, IEEE 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science(MHS), 28-30 November 2016, Nagoya University(2016).

3. Ganesh Kumar Mani, Yutaka Yasoda, Hiroshi Kimura and Kazuyoshi Tsuchiya, Performance Analysis of Ag/AgIO₃ & Sb₂O₃, Thin Films Based pH Sensor, The 16th International Meeting on Chemical Sensors, Korea(2016).

4. 土肥 颯一, Mani Ganesh Kumar, 槌谷 和義, FEM による生体細胞へのマイクロニードル穿刺解析とその形状の最適化, 日本機械学会 関東支部 第 56 回学生員卒業研究発表会, 2017 年 3 月 16 日東京理科大学

5. 都田 恒成, Ganesh Kumar Mani, 梶原 景正, 木村 穰, 槌谷 和義, マイクロニードル型 pH センサによる脳脊髄液の pH 測定 ,日本機械学会 関東支部 第 56 回学生員卒業研究発表会, 2017 年 3 月 16 日東京理科大学

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

槌谷 和義(Kazuyoshi Tsuchiya)
東海大学・工学部・教授
研究者番号：50399086

(2) 研究分担者

加藤 英晃 (Hideaki Katou)
東海大学・工学部・助教
研究者番号：90734476

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()